

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application: 2001年 5月11日

出 願 番 号

Application Number: 特願2001-140835

[ST.10/C]:

[JP2001-140835]

出 願 人

Applicant(s): 横河電機株式会社

2002年 1月29日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2002-3002035

【書類名】 特許願

【整理番号】 00N0176

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 21/64

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会  
社内

    【氏名】 田名網 健雄

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会  
社内

    【氏名】 杉山 由美子

【特許出願人】

    【識別番号】 000006507

    【氏名又は名称】 横河電機株式会社

    【代表者】 内田 勲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005326

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 蛍光読取装置  
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面が平坦な試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、

前記試料面からの蛍光は透過するが試料から反射した励起光は減衰する作用効果を有するバリアフィルタを、試料から反射した励起光が $\pm 5$ 度以内の入射角で入射するように前記像形成光学系内に配置したことを特徴とする蛍光読取装置。

【請求項 2】

前記バリアフィルタは、前記像形成光学系の結像レンズとこの結像レンズにより結像する像を検出する受光器の間に配置されたことを特徴とする請求項 1 記載の蛍光読取装置。

【請求項 3】

ケーラー照明における光源による励起光照射角が $\pm 5$ 度以内になるように構成したことを特徴とする請求項 1 記載の蛍光読取装置。

【請求項 4】

互いに波長の異なる複数の励起光を発生する光源アレイを用いて試料を照射するとき、試料に対して入射角 $\gamma$ で入射する励起光による反射励起光を受けるバリアフィルタは前記試料面に対して角度 $\gamma$ だけ傾けて配置されるようにしたことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の蛍光読取装置。

【請求項 5】

試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、

前記像形成光学系の結像レンズは、平凸型に形成されると共にその平面側に蛍光用干渉膜が形成されたレンズであることを特徴とする蛍光読取装置。

【請求項 6】

試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を

介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、

前記像形成光学系内に、対物レンズにより収束した励起光を遮光する遮光部材を取付け、受光器側への励起光の混入を防止するようにしたことを特徴とする蛍光読取装置。

【請求項 7】

試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、

前記像形成光学系内に、対物レンズにより収束した励起光を反射するミラーを取付け、受光器側への励起光の混入を防止するようにしたことを特徴とする蛍光読取装置。

【請求項 8】

試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した透過型の蛍光読取装置において、

前記蛍光物質からの蛍光は透過するが試料を透過した励起光は減衰する作用効果を有するバリアフィルタを、このバリアフィルタに対して前記試料を透過した励起光が±5度以内の入射角で入射するように前記像形成光学系内の試料と対物レンズの間または前記受光器の直前あるいはその両方の位置に配置したことを特徴とする蛍光読取装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、励起顕微鏡等に代表される蛍光読取装置に係り、特にケーラー照明型の顕微鏡等における励起光の除去に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

図9は従来のこの種の顕微鏡の概念的構成図である。レーザ等の平行光光源（図示せず）からの励起光は集光レンズ1で絞られ、その後ダイクロイックミラー2で反射して対物レンズ3に入射する。このとき、励起光は対物レンズ3の焦点

距離  $f$  の位置に結像し、これが第 2 光源となって対物レンズ 3 に入射する。

【0003】

試料 4 は対物レンズ 3 を透過した励起光で照射される。試料としては例えば表面が平坦なスライドガラス上に DNA を配置した DNA チップ等である。DNA チップの各サイト 4 1 では、標識した DNA の蛍光物質が励起光により励起されて蛍光を発する。その蛍光は、像形成光学系を介して受光器 7 上に結像する。すなわち、蛍光は実線で示すように対物レンズ 3 により平行光となってダイクロイックミラー 2 およびバリアフィルタ 5 を通過して結像レンズ 6 に入射する。結像レンズ 6 により結像した試料 4 の像は受光器 7 で検出される。

【0004】

この場合、試料面の全面にわたって照射された励起光の振る舞いを考察すると次の通りである。

破線で示すように平面が平坦な試料面で反射した励起光（この励起光を反射励起光あるいは戻り励起光と呼ぶ）は、対物レンズ 3 で絞られ焦点距離  $f$  の位置に収束する。そしてこの焦点位置を中間像面とするレンズ（ここでは結像レンズと呼ぶ）6 を通って受光器 7 に入る。

【0005】

なお、反射励起光は結像レンズ 6 を通る前にダイクロイックミラー 2 とバリアフィルタ 5 を透過する。バリアフィルタ 5 は蛍光は通すが反射励起光は除去（減衰）するように形成されており、このバリアフィルタ 5 を通すことにより背景光として受光器 7 へ混入する反射励起光を低減している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、このような従来の顕微鏡では、バリアフィルタで反射励起光を減衰するものの十分な減衰は得られなかった。蛍光分子測定等においては背景光を  $10^{-9}$  程度まで落とす必要があるが、上記の顕微鏡では  $10^{-7}$  程度の減衰率しか得られず、明らかに減衰不足であるという課題があった。

【0007】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、背景光となる反射励起光を十

分に減衰することのできる蛍光読取装置を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

このような目的を達成するために、請求項1の発明は、

試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、

前記試料面からの蛍光は透過するが反射励起光は減衰する作用効果を有するバリアフィルタを、反射励起光が $\pm 5$ 度以内の入射角で入射するように前記像形成光学系内に配置したことを特徴とする。

【0009】

反射励起光がバリアフィルタに $\pm 5$ 度以内の入射角で入射することにより、反射励起光はバリアフィルタで $10^{-9}$ 程度に減衰され、受光器での観察像にとって問題とならない程度の背景光としかならない。

【0010】

この場合、バリアフィルタの取付け位置は、例えば請求項2のように前記像形成光学系内の結像レンズと受光器の間に配置される。

また、ケーラー照明における第2光源による励起光照射角は、請求項3のように $\pm 5$ 度以内に設定する。

【0011】

また、請求項4のように、複数の光源を用いて、各光源に対応して複数の像を結像させる場合、試料に対して入射角 $\gamma$ で入射する励起光による反射励起光を受けるバリアフィルタは試料面に対して角度 $\gamma$ だけ傾けて配置する。これにより、いずれのバリアフィルタにも反射励起光は $\pm 5$ 度以内の入射角で入射でき、十分な減衰率を得ることができる。

【0012】

請求項5の発明では、試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、前記像形成光学系の結像レンズとして、平凸型に形成されると共にその平面側に蛍光用干渉膜が形成されたレンズを用いる。

【 0 0 1 3 】

このようなレンズを用いれば、バリアフィルタと同等の作用効果を簡単かつ小型で安価に実現することができる。

【 0 0 1 4 】

また、請求項 6 の発明では、試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、像形成光学系内に、対物レンズにより収束した反射励起光を遮光する遮光部材を取付け、受光器側への反射励起光の混入を防止するようにしたことを特徴とする。

【 0 0 1 5 】

このような構成によれば、対物レンズにより収束した反射励起光を遮光部材で遮光することにより、バリアフィルタを用いなくても受光器の背景光を容易に除去することができる。この場合、像形成光学系内の遮光部材は小片であるため、蛍光像形成に大きな影響を与えることはない。

【 0 0 1 6 】

また、請求項 7 の発明では、試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、前記像形成光学系中に、対物レンズにより収束した反射励起光を反射するミラーを取付け、受光器側への反射励起光の混入を防止するようにしたことを特徴とする。

【 0 0 1 7 】

このような構成によれば、対物レンズにより収束した反射励起光をミラーで反射することにより、バリアフィルタを用いなくても受光器の背景光を容易に除去することができる。この場合、像形成光学系内のミラーは小片であるため、蛍光像形成に大きな影響を与えることはない。

【 0 0 1 8 】

また、請求項 8 の発明では、試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した透過型の蛍光読取装置において、前記試料と対物レンズの間と、前記受光器

の直前との両方あるいはいずれか一方に上記と同様の作用効果を有するバリアフィルタを配置し、このバリアフィルタに対して試料を透過した励起光が±5度以内の入射角で入射するようにしたことを特徴とする。

## 【 0 0 1 9 】

このような構成によれば、透過型の装置においても、容易にバリアフィルタで透過励起光の十分な減衰ができ、観測像の背景光を十分少なくすることができる。

## 【 0 0 2 0 】

## 【発明の実施の形態】

以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図1は本発明に係る蛍光読取装置の一実施例を示す要部構成図である。図1において、図9と同等部分には同一符号を付してある。図9と異なるところはバリアフィルタ5を結像レンズ6と受光器7の間に配置した点である。

## 【 0 0 2 1 】

バリアフィルタ5の減衰率（入射光強度に対する出射光強度の比）の実験による実測値の例を図2に示す。図2に示すようにバリアフィルタの減衰率は光の入射角に依存し、 $10^{-7}$ 以上の減衰率を得るにはバリアフィルタへの入射角を±5度（deg）以下にする必要がある。なお、図2に示すデータは平行なレーザ光を用いて測定したものである。一般の分光光度計では発散または収束光を用いるため、このような値は得られない。

## 【 0 0 2 2 】

従来の蛍光読取装置では、平行な励起光を用いた場合でもバリアフィルタ5が対物レンズと結像レンズの間に配置されていたためバリアフィルタ5に入射する反射励起光の入射角（最大角度は $\alpha$ ）が±5度よりも大きく、 $10^{-7}$ 程度の減衰率しか得られなかった。

## 【 0 0 2 3 】

図1に示す構成によれば、バリアフィルタ5は結像レンズ6と受光器7の間に配置されているため、反射励起光は破線で示すようにバリアフィルタ5にほぼ垂直、すなわち±5度以下の入射角で入射する。したがって、反射励起光はここで



$10^{-9}$  程度減衰され、受光器 7 面での観測像の背景光を十分に少なくすることができる。

【 0 0 2 4 】

なお、本発明は上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

【 0 0 2 5 】

例えば、以下のような構成を採用することもできる。

( 1 ) 光源像の大きさに係る場合

図 3 に白色光等の非レーザ光を用いた場合のケーラー照明系の要部模式図を示す。光源 1 1 ( 光源の直径が  $a$  ) からの光が集光レンズ 1 に入射して直径  $a'$  の第 2 光源 1 2 を作る。この第 2 光源 1 2 により試料 4 は照射される。このときの試料 4 を照射する励起光の角度 ( ここではこの角度を照射角と呼ぶ )  $\beta$  は第 2 光源 1 2 の直径に対応する。

【 0 0 2 6 】

透過型や反射型の顕微鏡ではケーラー照明で大きな角度  $\beta$  がないと必要十分な分解能は得られない。蛍光顕微鏡の場合も同様に光源像 1 2 の直径  $a'$  は元の光源 1 1 の直径  $a$  の 1 0 倍程度に拡大され、角度  $\beta$  を大きくしている。

【 0 0 2 7 】

しかし、角度  $\beta$  を大きくするとバリアフィルタ 5 への入射角も大きくなり、励起光の減衰率を低下させるため、角度  $\beta$  には限度がある。光源像と対物レンズ 3 の焦点距離  $f$  の間には、次の関係がある。

$$a' / 2 = f \beta$$

すなわち、

$$\beta = a' / ( 2 f )$$

ここに、 $f$  は対物レンズ 3 の焦点距離

【 0 0 2 8 】

十分な減衰率を得るためには、 $\beta$  を  $\pm 5$  度以下にする必要がある。  $\pm 5$  度以下に抑えるには、例えば光源の大きさあるいは励起光学系の焦点距離  $f'$  等を調節すればよい。

## 【 0 0 2 9 】

## ( 2 ) 光源アレイの場合

図 4 は緑色 G と赤色 R のように波長の異なる 2 つの光源からなる光源アレイを使用した場合の構成図である。G 光源はレンズ 1 から距離  $f'$  の位置の光軸上に置かれ、R 光源はその位置で光軸より  $b$  だけ離れた所に置かれている。このような配置では、水平に置かれた試料面に対して、G 光源からの光は垂直に入り、他方の R 光源からの光は照射角  $\gamma$  ( $= f' \cdot b$ ) で入る。

## 【 0 0 3 0 】

試料面で反射した励起光は対物レンズ 3 およびダイクロイックミラー 2 を透過した後、短波長側 (G 光源側) の光は第 2 のダイクロイックミラー 2 a で反射し、他方の長波長側 (R 光源側) の光は第 2 のダイクロイックミラー 2 a を透過する。

そして前者は結像レンズ 6 とバリアフィルタ 5 を介して受光器 7 上に結像し、後者は結像レンズ 6 a とバリアフィルタ 5 a を介して受光器 7 a 上に結像する。

## 【 0 0 3 1 】

この場合、バリアフィルタ 5 a を水平に取り付けていると R 光源の反射励起光は  $\gamma$  度傾いた角度で入射する。そこで直角に入射するようにバリアフィルタ 5 a を水平面から  $\gamma$  度傾けて配置する。

これにより、試料面での反射励起光はいずれもバリアフィルタ 5, 5 a に直角に入射することになり、それぞれ十分に減衰される。

## 【 0 0 3 2 】

## ( 3 ) 結像レンズに係る変形例

図 5 は結像レンズの要部構成図である。バリアフィルタ 5 の機能と結像レンズ 6 の機能を併せ持つ蛍光フィルタ付レンズ 6 0 を用いた場合の例である。

この蛍光フィルタ付レンズ 6 0 は、平凸レンズ 6 1 の平面側に蛍光用干渉膜 6 2 を貼り付けたものであり、この干渉膜 6 2 により反射励起光をバリアフィルタと同様に減衰させるものである。

## 【 0 0 3 3 】

## ( 4 ) ポイントマスク型への変形例

図 6 に示すように、試料からの反射励起光が対物レンズ 3 により収束する所に遮光部材 2 1 を配置して反射励起光をカットする。遮光部材 2 1 は例えば透明板あるいは水平方向へ放射状に伸びた 3 本の支柱等で支える。遮光部材 2 1 の直径  $\phi$  が  $1.22\lambda/NA$  (ただし、 $\lambda$  は励起光の波長、 $NA$  は対物レンズ 3 の開口数) 程度であれば、90% 以上反射励起光をカットできる。この場合、上記実施例におけるようなバリアフィルタ 5 を用いなくてよい。あるいは、減衰率の低い安価なフィルタを用いてもよい。

## 【 0 0 3 4 】

## (5) ポイントミラー型への変形例

上記実施例に示すダイクロイックミラー 2 の代わりに、図 7 に示すようにケーラー照明の第 2 光源部に小片のミラー 2 2 を配置する。このミラー 2 2 は、ダイクロイックミラー 2 と同様に光源 1 1 からの励起光を反射し、試料を照射すると共に、対物レンズ 3 で絞られた反射励起光も光源側へ反射する。したがって、反射励起光は受光器 7 (図示せず) へは入らない。

なお、ミラー 2 2 は透明基板や支柱による支持体 2 3 により保持され、その取付け位置と角度が維持される。

## 【 0 0 3 5 】

## (6) 透過蛍光型の場合

図 8 は透過型蛍光読取装置の一実施例図である。この場合も同様にバリアフィルタを用いて透過励起光を減衰させることができる。バリアフィルタ 5, 5 a を、試料 4 と対物レンズ 3 との間と、結像レンズ 6 と検出器 7 との間にそれぞれ配置する。なお、バリアフィルタはいずれか一方だけにしても差し支えない。

なお、この場合、対物レンズ 3 と結像レンズ 6 とはテレセントリック系になっている。

## 【 0 0 3 6 】

## 【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) 請求項 1 ~ 4 の発明によれば、励起光をバリアフィルタに  $\pm 5$  度以内の入射角で入射させるようにしたため、容易に励起光を減衰させることができる。

(2) 請求項5の発明によれば、結像レンズを平凸レンズとし、これに蛍光用干渉膜を貼り付けることにより、バリアフィルタを用いることなく、バリアフィルタを用いたのと同等の作用効果を容易に実現することができる。

【0037】

(3) 請求項6, 7の発明によれば、対物レンズにより絞られた反射励起光ビームを遮光または反射させるため、バリアフィルタを用いなくても受光器への反射励起光の混入を容易に防止することができる。

(4) 請求項8の発明によれば、透過型の蛍光読取装置においてもバリアフィルタを配置して受光器に入る励起光を容易に減衰させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明に係る蛍光読取装置の一実施例を示す要部構成図である。

【図2】

バリアフィルタの減衰率特性図である。

【図3】

ケーラー照明系の場合の説明図である。

【図4】

光源アレイを用いた場合の説明図である。

【図5】

結像レンズの他の実施例を示す構成図である。

【図6】

遮光部材を用いた場合の構成図である。

【図7】

ミラーを用いた場合の構成図である。

【図8】

透過型蛍光読取装置に係る一実施例構成図である。

【図9】

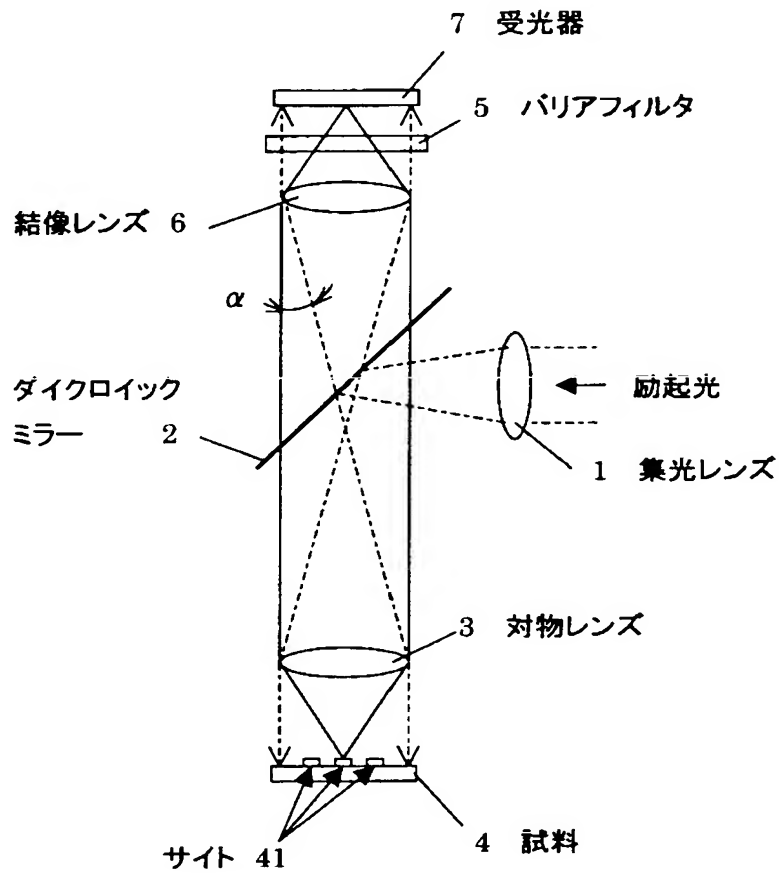
従来の蛍光読取装置の一例を示す構成図である。

【符号の説明】

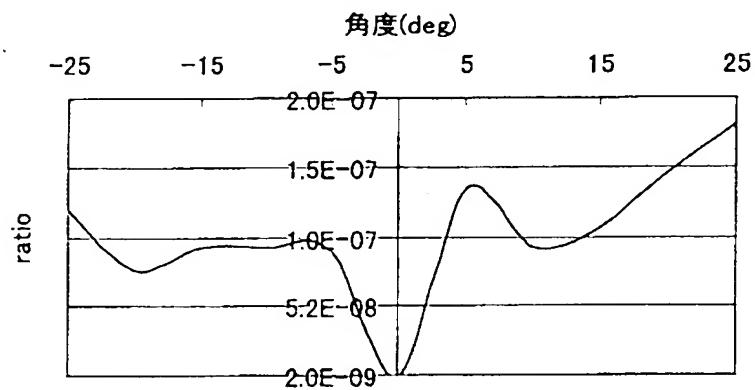
- 1 集光レンズ
- 2, 2 a ダイクロイックミラー
- 3 対物レンズ
- 4 試料
- 5, 5 a バリアフィルタ
- 6 結像レンズ
- 7 受光器
- 1 1 光源
- 1 2 第 2 光源
- 2 1 遮光部材
- 2 2 ミラー
- 2 3 支持体
- 6 0 蛍光フィルタ付レンズ
- 6 1 平凸レンズ
- 6 2 蛍光用干渉膜

【書類名】 図面

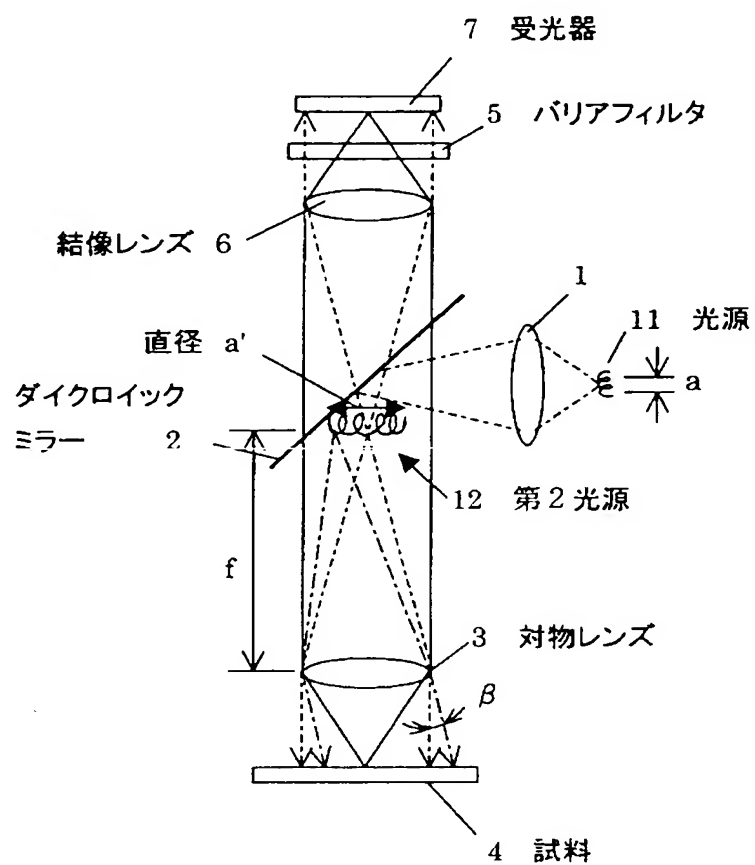
【図 1】



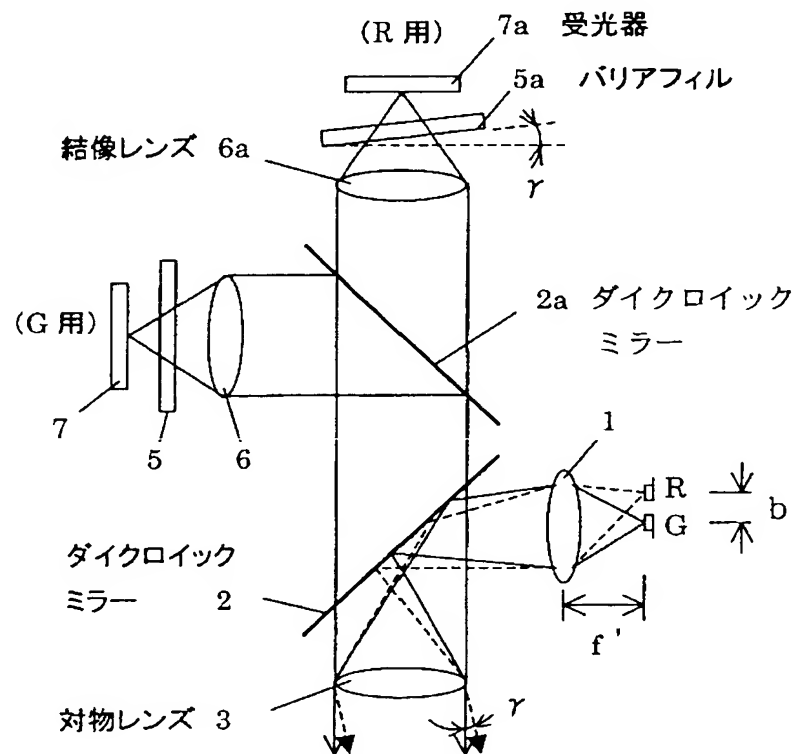
【図 2】



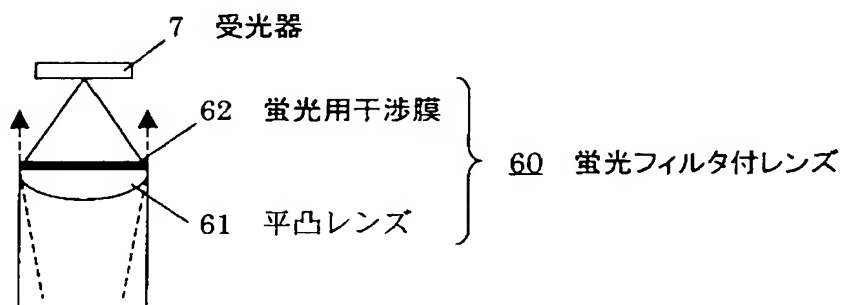
【図3】



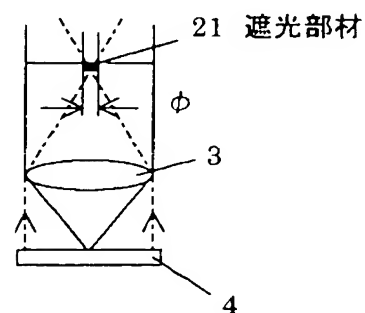
【図 4】



【図 5】

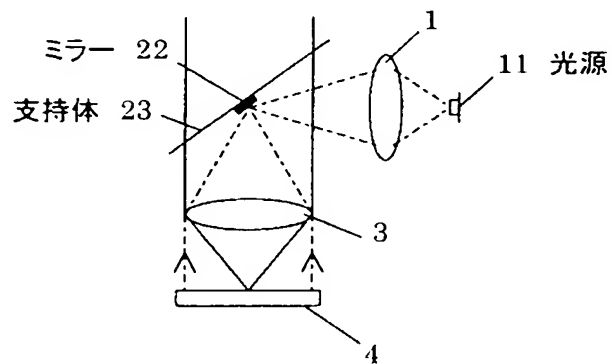


【図 6】

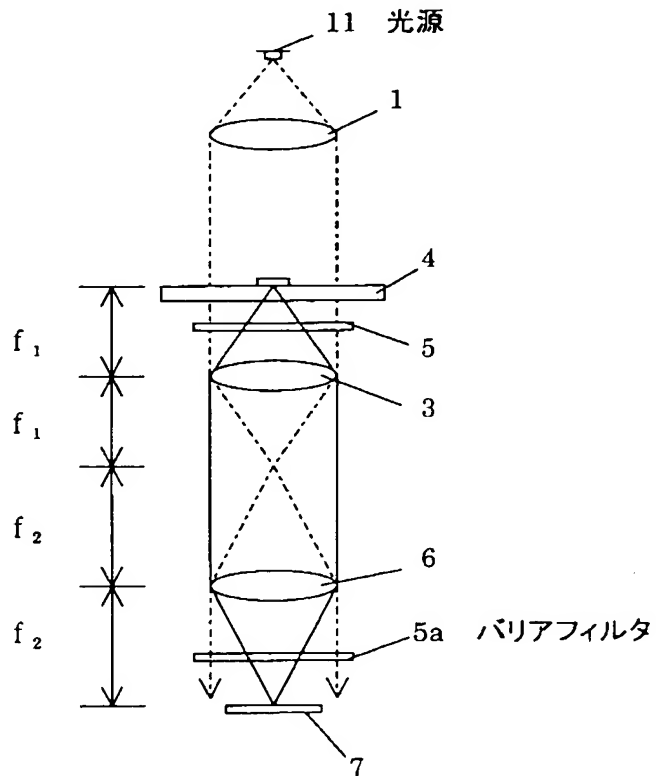




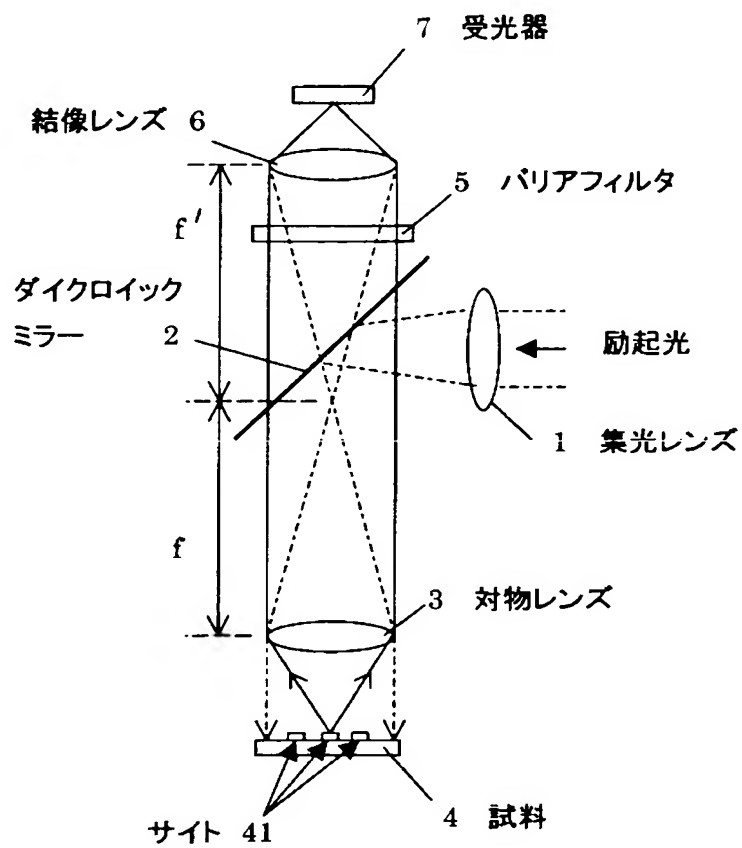
【図 7】



【図 8】



【図9】



【書類名】                      要約書

【要約】

【課題】 背景光となる反射励起光を十分に減衰することのできる蛍光読取装置を実現する。

【解決手段】 試料に励起光を照射し、試料中の蛍光物質から発生する蛍光を像形成光学系を介して結像し、その像を受光器で読取るように構成した蛍光読取装置において、前記試料面からの蛍光は透過するが試料から反射した励起光は減衰する作用効果を有するバリアフィルタを、試料から反射した励起光が±5度以内の入射角で入射するように前記像形成光学系内に配置する。

【選択図】                      図 1

認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 1 4 0 8 3 5
受付番号	5 0 1 0 0 6 7 9 1 4 7
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 3 年 5 月 1 4 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成13年 5月11日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006507]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号

氏 名 横河電機株式会社